DELPHION

RESEARCH

Log Out | Work Files | Saved Searches | My Account

Search: Quick/Number Boolean Advanced Der

Derwent Record

View: Expand Details Go to: Delphion Integrated View

Tools: Add to Work File: Create new Wor

Derwent Title: **Light induced immobilisation of biological mols as mono-layers - on photoactivatable surfaces by irradiation, allowing simple binding of proteins etc. for analysis, bio:sensor prodn. etc.**

Original Title: WO9116425A1: METHOD FOR THE LIGHT-INDUCED IMMOBILIZATION OF BIOMOLECULES ON CHEMICALLY "INERT" SURFACES

Assignee: **DOLDER M** Individual
KLINGLER-DABRAL V Individual
SIGRIST H Individual
WEGMUELLER B Individual

Inventor: **DOLDER M; KLINGLER D V; KLINGLER-DABRAL V; SIGRIST H; WEGMUELLER B;**

Accession/ Update: **1991-339813 / 199739**

IPC Code: **C12N 11/06 ;**

Derwent Classes: **B04**; **D16**;

Manual Codes: **B04-B01B**(Fats, lanolin, lipids) , **B04-B02C**(Enzymes [general]) , **B04-B04A**(Proteins, nucleic acids, cells general) , **B04-B04C**(Antigens, general antibody (pre-94)) , **B12-K04** (Diagnosis and testing [general]) , **D05-A01C2**(General methods of binding fermentation enzymes to carriers) , **D05-H09**(Testing and detection [exc. bacteria, fungi, viruses]) , **D05-H10**(Fixing biological substances or cells to a carrier and the carriers themselves) , **D05-H12**(DNA, CDNA, transfer vectors, RNA.) , **D09-C01**(Prostheses)

Derwent Abstract: (WO9116425A) Light-induced immobilisation of biological molecules (I), e.g. proteins, nucleic acid, carbohydrates or lipids, comprising covalently binding (I), in monomolecular layers on photo-activatable carriers by irradiation with light or application of electrical energy.
USE/**Advantage** - Proteins, carbohydrates and nucleic acids are immobilised for chemical analysis or structure elucidation; antigens, antibodies, haptens, etc. (which retain their biological activity) for analytical uses; enzymes, receptors and immunological active substances for prepn. of biosensors, proteins, lipids and/or carbohydrates are bonded to implants so as to inhibit rejection of foreign substances, and proteins (or their fragments) are immobilised to produce molecular switching elements.
This process allows regiospecific and topological orientation of (I) on 'inert' surfaces, and avoids the damaging effects of heat-induced immobilisation. It is very simple; allows immobilisation on microtitre plates without pretreatment, and provides high binding yields.

Dwg.0/0, Dwg.0/0

Family:

PDF	Patent	Pub. Date	Derwent Update	Pages	Language	IPC Code
	WO9116425A *	1991-10-31	199146		English	C12N 11/00

Des. States: (N) JP US
(R) AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LU NL SE

Local appls.:

☑ DE59108783G = 1997-08-21 199739 German C12N 11/06

Local appls.: Based on EP00484472 (EP 484472)
Based on WO09116425 (WO 9116425)
DE1991000508783 Filed:1991-04-11 (91DE-0508783)
WO1991CH0000085 Filed:1991-04-11 (91WO-CH00085)
EP1991000906480 Filed:1991-04-11 (91EP-0906480)

EP0484472B1 = 1997-07-16 199733 5 German C12N 11/06

Des. States: (R) AT BE CH DE DK FR GB IT LI NL SE

Local appls.: Based on WO09116425 (WO 9116425)
WO1991CH0000085 Filed:1991-04-11 (91WO-CH00085)
EP1991000906480 Filed:1991-04-11 (91EP-0906480)

EP0484472A = 1992-05-13 199220 16 German C12N 11/00

Des. States: (R) AT BE CH DE DK FR GB IT LI NL SE

Local appls.: EP1991000906480 Filed:1991-04-11 (91EP-0906480)

INPADOC Legal Status: Show legal status actions

First Claim: Show all claims

PATENTANISMKÜCHE 1. Verfahren zur lichtinduzierten Unmobilisierung von Biomolekülen (z.B. Eiweiss-stoffen, Nukleinsäuren, Kohlehydraten, Lipiden) zum Zweck einer analytischen, diagnostischen, medizinischen und/oder gewerblichen Verwendung dadurch gekennzeichnet, dass Bio- moleküle, in monomolekularen Schichten auf photoaktivierbare Trägermaterialien durch Einstrahlen von Licht oder Applikation elektrischer Energie kovalent gebunden werden.

Priority Number:

Application Number	Filed	Original Title
CH1990000001253	1990-04-12	

Citations:

PDF	Patent	Original Title
☑	EP0175973	SUPPORT MATERIAL FOR THE USE IN IMMUNOASSAYS
☑	JP01005489	FUNCTIONAL ORGANIC THIN FILM AND PRODUCTION THEREOF
☒	US3959078	ENZYME IMMOBILIZATION WITH A THERMOCHEMICAL-PHOTOCHEMICAL BIFUNCTIONAL AGENT
☒	US4597999	METHOD FOR COUPLING A HYDROCARBON CONTAINING MOLECULAR SPECIES
		Msg: 2.Jnl.Ref
		Msg: 3.Jnl.Ref

Related Accessions:

Accession Number	Type	Derwent Update	Derwent Title
C1991-146742	C		
1 item found			

Title Terms: LIGHT INDUCE IMMOBILISE BIOLOGICAL MOLECULAR MONO LAYER

PHOTOACTIVE SURFACE IRRADIATE ALLOW SIMPLE BIND PROTEIN ANALYSE BIO SENSE PRODUCE

Pricing Current charges

Derwent Searches: Boolean | Accession/Number | Advanced

Data copyright Thomson Derwent 2003

THOMSON

Copyright © 1997-2006 The Thor

Subscriptions | Web Seminars | Privacy | Terms & Conditions | Site Map | Contact U

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 91/16425
C12N 11/06	A1	(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 31. Oktober 1991 (31.10.91)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/CH91/00085

(22) Internationales Anmeldedatum: 11. April 1991 (11.04.91)

(30) Prioritätsdaten:
1253/90-8 12. April 1990 (12.04.90) CH

(71)(72) Anmelder und Erfinder: SIGRIST, Hans [CH/CH]; Institut für Biochemie, Universität Bern, Freiestrasse 3, CH-3012 Bern (CH). KLINGLER-DABRAL, Vibhuti [IN/DE]; Weichgasse 7, D-6103 Griesheim (DE). DOLDER, Max [CH/CH]; WEGMUELLER, Bernhard [CH/CH]; Institut für Biochemie, Universität Bern, Freiestrasse 3, CH-3012 Bern (CH).

(74) Gemeinsamer Vertreter: SIGRIST, Hans; Institut für Biochemie, Universität Bern, Freiestrasse 3, CH-3012 Bern (CH).

(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: METHOD FOR THE LIGHT-INDUCED IMMOBILIZATION OF BIOMOLECULES ON CHEMICALLY "INERT" SURFACES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR LICHTINDUZIERTEN IMMOBILISIERUNG VON BIOMOLEKÜLEN AN CHEMISCH "INERTEN" OBERFLÄCHEN

(57) Abstract

The invention concerns a process for the photochemically induced immobilization of biomolecules (protein molecules, nucleic acids, lipids, carbohydrates). The process makes it possible to immobilize biomolecules by covalent bonding in molecular layers on "inert" substrates. The bonding reaction is activated by light irradiation in the absorption region of photo-activatable reagents or by supplying the appropriate amount of electrical energy and therefore is not aggressive. Substrates (e.g. glass, organic or inorganic plastics, silicon films, mica) are pre-treated by prior art methods in such a way that they can be derived with hetero-bifunctional photo-activatable wetting-agent molecules. Multiple-derived polymers can also be used as linker molecules to simultaneously bond ligand and substrate. Diazirines or aryl azides, for instance, can be used as the photo-activatable function. The chemical properties of the non-photo-active heterofunctions depend on the functional groups with which the substrate or linker molecules were previously derived (e.g. amino, carboxyl, thio groups). Coating the substrate with a hetero-bifunctional wetting-agent molecule gives a substrate with a photo-active surface coating. Owing to the high reactivity of the photo-generated intermediate products (carbenes, nitrenes), biomolecules of different chemical composition are covalently bound by light activation of the substrate, without the need for limiting reaction conditions. Length of irradiation time and intensity and wavelength of the light used (i.e. the energy used), as well as the frequency of occurrence of the photo-activatable groups on the substrate (packing density) determine the bonding efficiency and the size of the area occupied.

(57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur photochemisch induzierten Immobilisierung von Biomolekülen (Eiweissmolekülen, Nukleinsäuren, Lipiden, Kohlehydraten). Das Verfahren ermöglicht die kovalente Immobilisierung von Biomolekülen in molekularen Schichten an "inerte" Trägermaterialien. Die Kopplungsreaktion wird durch Lichteinstrahlung im Absorptionsbereich der photoaktivierbaren Reagentien oder durch Applikation der entsprechenden elektrischen Energie ausgelöst und ist deshalb sehr schonend. Trägermaterialien (z.B. Glas, organische oder anorganische Kunststoffe, Siliziumschichten, Glimmer) werden nach bekannten Verfahren derart vorbehandelt, dass sie mit heterobifunktionellen, photoaktivierbaren Vernetzermolekülen deriviert werden können. Ebenso können mehrfach-derivierte Polymere als Linkermoleküle zur gleichzeitigen Kupplung von Ligand und Trägermaterial eingesetzt werden. Als photoaktivierbare Funktion werden beispielsweise Diazirine oder Arylazide verwendet. Die chemischen Eigenschaften der nicht photoaktiven Heterofunktionen richten sich nach den funktionellen Gruppen, mit denen dasTrägermaterial oder das Linkermolekül vorgängig deriviert wird (z.B. Amino-, Carboxyl-, Thiolfunktion). Durch Belegung des Trägers mit einem heterobifunktionellen Vernetzermolekül resultiert ein Trägermaterial mit photoaktiver Oberflächenbeschichtung. Aufgrund der hohen Reaktivität der photogenerierten Intermaediärprodukte (Carbene, Nitrene) werden Biomoleküle mit unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung ohne Vorgabe einschränkender Reaktionsbedingungen durch Lichtaktivierung des Trägers kovalent gebunden. Dauer und Abmessung des eingestrahlten Lichtes (Energie), aber auch die Häufigkeit der photoaktivierbaren Gruppen auf dem Trägermaterial (Belegungsdichte), bestimmen die Kupplungseffizienz und die Grösse des zu belegenden Bereiches.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	MG	Madagaskar
AU	Australien	FI	Finnland	ML	Mali
BB	Barbados	FR	Frankreich	MN	Mongolei
BE	Belgien	GA	Gabon	MR	Mauritanien
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BG	Bulgarien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BJ	Benin	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	PL	Polen
CA	Kanada	IT	Italien	RO	Rumänien
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
DE	Deutschland	LU	Luxemburg	TG	Togo
DK	Dänemark	MC	Monaco	US	Vereinigte Staaten von Amerika

BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

Verfahren zur lichtinduzierten Immobilisierung von Biomolekülen an chemisch "inerten" Oberflächen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur lichtinduzierten Immobilisierung von Biomolekülen in monomolekularen Schichten unter Verwendung von photoaktivierbaren Arylaziden oder Diazirinen als molekulare Klebstoffe.

Ausgelöst durch die schnelle Entwicklung und Miniaturisierung von bioanalytischen Methoden einerseits, und den Fortschritten der Biosensortechnik andererseits besteht ein reges Interesse, die Wechselwirkung zwischen Biomolekülen und Oberflächen organisch-synthetischer oder anorganischer Natur besser zu verstehen. Gleichwertig in der Bedeutung ist die Entwicklung von Methoden zur wirksamen, chemisch stabilen Kopplung von Biomolekülen an Trägermaterialien, wobei erstere weder chemisch vorbehandelt noch extremen (Kopplungs)Reaktionsbedingungen ausgesetzt werden müssen. Analytisch/diagnostische Verfahren und die Herstellung von oberflächen-aktiven Biosensoren erfordern eine geeignete Verankerung der Wirkstoffe in monomolekularen Schichten. Weil die Oberflächen vieler, zu diesem Zweck bisher eingesetzten Trägermaterialien keine oder wenig geeignete chemisch reaktive Funktionen besitzen, wurden Biomoleküle bisher meist oberflächendeckend mittels gruppenspezifischen Modifikationsreaktionen an vorbehandelte Trägermaterialien gebunden. Chemische Immobilisierungen dieser Art sind grundsätzlich möglich. Das Verfahren setzt jedoch das Vorhandensein von funktionellen Gruppen voraus, die sich gezielt aktivieren lassen. Zudem kann die monomolekulare Belegung von Oberflächen mit bisher verwendeten Verfahren lediglich oberflächendeckend durchgeführt werden (bulk-Verfahren).

Es ist das Ziel der Erfindung makromolekulare Stoffe, insbesondere Biomoleküle, regiospezifisch und topologisch orientiert an chemisch "inerte" Oberflächen zu binden. Es sollen Methoden aufgezeigt werden, die erlauben, monomolekulare Schichten von biologisch aktiven Wirkstoffen (Eiweissmoleküle, Nukleinsäuren, Kohlehydrate, Lipide, niedermolekulare Wirkstoffe) über geeignete Vernetzer an festen Phasen (Trägermaterial) von unterschiedlicher chemischer Natur zu immobilisieren. Zur kovalenten Immobilisierung sollen photoaktivierbare Vernetzermoleküle eingesetzt werden. Photoaktivierbare Reagentien sind den thermo-chemischen Vernetzungsreaktionen überlegen, weil die Reaktion photo-optisch oder durch gezielte

Applikation elektrischer Energie bezüglich Ort und Abmessung selektioniert und die Kopplungsreaktion zeitlich kontrolliert ausgelöst werden kann.

In der vorliegenden Arbeit werden zwei Verfahren beschrieben, deren Anwendung die photochemische Immobilisierung von Biomolekülen an "inerten" Trägern zur Folge hat. Die kovalente Bindung der Biomoleküle an den Träger erfolgt über photogenerierte Carbene oder Nitrene. Carbene, ebenso wie Nitrene sind chemisch äusserst reaktive Zwischenprodukte. Sie sind geeignet, Biomoleküle durch Insertionsreaktionen in C-H, C-C, C=C, N-H, O-H, S-H Bindungen kovalent zu binden. Das resultierende breitgefächerte Reaktionsspektrum der photogenerierten Carbene und Nitrene übertrifft deshalb die thermo-chemischen Modifikationsreaktionen bezüglich den erforderten Reaktionsbedingungen. Durch Einsatz von Laserlichtquellen oder durch Applikation der, zur Aktivierung der reaktiven Funktionen erforderlichen Energie, können kleinste Oberflächen selektiv aktiviert und mit Biomolekülen monomolekular belegt werden.

Die photochemisch induzierte Immobilisierung von Biomolekülen kann, unter Verwendung eines mehrfach derivierten Linkermoleküls in einem einzigen Reaktionsschritt erfolgen. Anderseits kann ein zweistufiges Verfahren durchgeführt werden. Letzteres setzt die kovalente chemische Kopplung eines (niedermolekularen) Vernetzermoleküls an den Träger voraus.

Das erstgenannte, einstufige Kopplungsverfahren besteht aus den folgenden Teilschritten.

1. Ein Linkermolekül (z.B. ein synthetisches oder natürliches Polymer) wird mit heterobifunktionellen, photoaktivierbaren Vernetzermolekülen (z.B. 3-(Trifluoromethyl)-3-(m-isothiocyanophenyl)diazirin oder 3-(Trifluoromethyl)-3-(m-aminophenyl) diazirin) mehrfach deriviert (= Photolinkerpolymer).

2. Das Photolinkerpolymer wird auf die "inerte" Oberfläche aufgetrocknet.

3. Zu immobilisierende Biomoleküle werden gelöst auf die photolinker-belegten Oberfläche aufgetragen. Das Lösungsmittel wird partiell oder gänzlich entfernt.

4. Durch Einstrahlen von Licht mit geeigneter Wellenlänge (Diazirine: 350 nm) werden die photoaktivierbaren funktionellen Gruppen aktiviert und die Kopplungsreaktion ausgelöst.

5. Nach erfolgter Photokopplung werden nicht-gebundene Biomoleküle durch mehrmaliges Waschen der Oberfläche (z.B. durch Filtration) entfernt. Mit diesem Schritt können gleichzeitig Begleitsubstanzen (Pufferkomponenten, Salze, Detergentien) ausgetauscht oder aus dem System entfernt werden

Für das zweistufige Immobilisierungsverfahren sind die folgenden Teilschritte notwendig:

1. Das Trägermaterial (z.B. Glas, polymere Werkstoffe, Siliziumoxid, Glimmer) wird nach bekannten Verfahren mit funktionellen Gruppen belegt (z.B. Einführung von primären oder sekundären Aminen, Carboxylgruppen, Thiolfunktionen).

2. Derart modifiziertes Trägermaterial wird mit heterobifunktionellen photoaktivierbaren Vernetzermolekülen (z.B. p-Azidophenyl-isothiocyanat, 3-(trifluoromethyl)-3-(m-isothiocyanophenyl)diazirine, p-Azidoanilin, 3-(trifluoromethyl)-3-(m-aminophenyl)diazirine oder N-(4-Azidophenylthio)-phthalimid) deriviert und zum photoaktivierbaren Träger umgesetzt.

3. Zur Immobilisierung werden die Biomoleküle durch Eintauchen in Lösungen, durch Auftropfen (Adsorption) oder mittels elektrophoretischen Methoden (Elektroblotting) mit dem photoaktivierbaren Trägermaterial in Kontakt gebracht.

4. Durch Einstrahlen von Licht definierter Wellenlänge oder Applikation der entsprechenden Energie (Arylazide 260 nm; Diazirine 350 nm) werden die Träger unter Inertgas aktiviert. Damit wird die Kupplungsreaktion ausgelöst.

5. Nach erfolgter Kupplung werden nicht-gebundene Biomoleküle durch mehrmaliges Waschen des Trägers oder durch Filtration entfernt. Bei diesem Schritt können gleichzeitig Begleitsubstanzen (Pufferkomponenten, Salze, Detergentien) ausgetauscht oder entfernt werden.

6. Damit sind die mit Biomolekülen belegten Träger zur Anwendung bereit. Falls das Trägermaterial durch regioselektive Aktivierung der Oberfläche regiospezifisch mit mehreren Biomolekülen (z.B. Rezeptoren, Enzymen, Immunoreagenzien) belegt werden soll, können die Schritte 3 bis 6 mehrfach wiederholt werden. Anwendungsmöglichkeiten sind in den Patentansprüchen 2 bis 6 umschrieben.

Beispiel einer Anwendung des Einschritt-Kopplungsverfahrens

In Analogie zu bestehenden immunologischen Verfahren können Proteine (Streptavidin, Immunoglobuline) und erstmals auch Nukleinsäuren in einem erstaunlich einfachen Prozess kovalent auf Mikrotiterplatten immobilisiert werden. Das Vorgehen (PhotoLink) verlangt keine spezielle Vorbehandlung des zu bindenden Biomoleküls und handelsübliche Trägermaterialien (z.B. Nunc Immunoplate Maxisorp) können ohne Vorbehandlung verwendet werden. Mikrotiterplatten werden mit einem Polymer (Polypeptid) belegt, welches vorgängig mehrfach mit photoaktivierbaren funktionellen Gruppen bestückt wurde (Photolinkerpeptid). Die Immobilisation erfolgt nach Belichtung durch Carbeninsertion. Die am Trägermolekül angebrachten photoaktiven funktionellen Gruppen (z.B. Diazirine) reagieren gleichzeitig mit dem zu bindenden Molekül (z.B. Protein, DNS, Immunoglobulin) und mit der zu belegenden Oberfläche (z.B. Polystyrol).

Herstellung des Photolinkerpeptides

Rinderserumalbumin (80 mg) wird in 14 ml TEA/HAc-Puffer, pH 10.5 (100 ml H_2O, 100 ml Aceton, 1 ml Triethylamin, 1 ml Essigsäure (2 M)) suspendiert und im Ultraschallbad beschallt bis die Lösung klar ist. Zu 24 µl 3-(Trifluoromethyl)-3-(m-aminophenyl)diazirin (TRIMID, bergestellt nach Dolder et al. (1990) J. Prot. Chem. 9, 407-415) in Tetrachlorkohlenstoff werden 6 ml Aceton gegeben. Proteinlösung und Reagens werden in einem 100 ml Rundkolben gemischt und während einer Stunde bei 70°C rückflussiert. Die Reaktionslösung wird anschliessend dreimal mit je 30 ml Heptan/Essigsäureethylester (6:3 v/v) extrahiert und die organische Phase verworfen. Die Wasserphase wird über Nacht lyophilisiert. Das trockene Produkt wird in 6 ml 0.4% (w/v) Natrium Dodecylsulfat in PBS (150 mM NaCl, 5 mM Natrium Phosphat pH 7,4) suspendiert und beschallt bis die Lösung klar ist. Zur weiteren Reinigung wird das Produkt an Sephadex G-15 medium in PBS

chromatographiert und die vereinigten proteinhaltigen Fraktionen 48 Stunden gegen H_2O bidest dialysiert (Spectrapor cut off 6000-8000). Nach Lyophilisation wird das Produkt bei -20°C aufbewahrt.

Belegen der "inerten" Oberfläche

Die Reaktionsgefässe der Titerplatten (Nunc-Immuno Module, Polysorp F8) werden mit je 40 µl Photolinkerpeptid in H_2O (entsprechend 1 nMol TRIMID-deriviertem Rinderserumalbumin) versetzt. Der Boden des Reaktionsgefässes soll gleichmässig benetzt sein. Die Reaktionsgefässe werden anschliessend am Wasserstrahlvakuum während einer Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Derart belegte Titerplatten können lichtdicht verpackt bei -20°C mindestens 3 Monate aufbewahrt werden.

Applikation der Biomoleküle und lichtinduzierte Immobilisierung

Die zur Immobilisierung eingesetzten Biomoleküle (Liganden) werden in einem beliebigen Puffersystem gelöst (z.B. 1 mg Streptavidin in 2 ml PBS) und bis zur gewünschten Endkonzentration (z.B. 10 bis 1000 pMol Streptavidin pro 30 µl) verdünnt. Die mit Photlinkerpeptid belegten Reaktionsgefässe werden mit 30 µl Ligandlösung versetzt und zwei Stunden bei Raumtemperatur am Wasserstrahlvakuum getrocknet. Zur Photoaktivierung werden die Reaktionsgefässe 5 - 30 Minuten der Strahlung von UV Lichtquellen (z.B. parallel angeordnete UV (366 nm) Röhren, Silvania F8T5/BLB USA, 8 Watt oder Quecksilberdampflampe HBO 350, Osram mit der auf Seite 11 beschriebenen Filterkombination) ausgesetzt, und anschliessend je 5 mal mit PBS, 5 mal mit H_2O und zweimal mit Alkohol gewaschen.

Quantitativer Nachweis der Immobilisierung

Die Immobilisierung von Streptavidin wird durch Zugabe von radioaktiv markiertem [^{14}C]-Biotin quantifiziert. Nach beschriebenem Verfahren immobilisierte Immunoglobuline können mit einem zweiten Antikörper komplexiert werden, welcher alkalische Phosphatase kovalent gebunden trägt und somit das Substrat p-Nitrophenylphosphat umsetzen kann. Freigesetztes p-Nitrophenol wird durch Absorptionsmessung (405 nm) in kommerziell erhältlichen ELISA-

Reader Geräten quantitativ bestimmt. In analogem Vorgehen kann Digoxigenin markierte DNS gekoppelt und über anti-Digoxigenin Antikörper und alkalische Phosphatase nachgewiesen werden.

Die kovalente Immobilisierung von Biomolekülen verschiedener Klassen illustriert das breite Anwendungsspektrum und grosse Anwendungspotential des weitgehend standardisierten Verfahrens. Die Ausbeuten an gebundenen Molekülen sind gut. Das Verfahren lässt sich uneingeschränkt in bestehende Analyseprozesse (z.B. ELISA) integrieren. Die Nachweisempfindlichkeit liegt im Bereich analoger Methoden, welche auf thermo-chemischer Immobilisierung beruhen (z.B. Ausbildung einer Amidbindung, Borhydrid Reduktion). Nebst der Unabhängigkeit von funktionellen Gruppen am Liganden und der Unabhängigkeit von einschränkenden Reaktionsbedingungen, sind die Mehrfachverwendung antigen-belegter Mikrotiterplatten und die einfach durchführbare Kopplung von Proteinen und Nukleinsäuren von analytischer und verfahrenstechnischer Bedeutung.

Das Verfahren stellt erstmals eine anwendbare, erprobte Methode zur Immobilisierung von Biomolekülen dar, die bis zur Marktreife entwickelt werden konnte. Ein bedeutender Vorteil des beschriebenen Vorgehens ist die Tatsache, dass Diazirine bei fensterglas-gefiltertem Tageslicht gehandhabt werden können. Ihre Aktivierung erfolgt bei 350 nm mit kommerziell erhältlichen Beleuchtungsgeräten.

Beispiel einer Anwendung der Zwei-Schritt Immobilisierung

Das Verfahren soll anhand der Sequenzanalyse eines Hexapeptides dargelegt werden. Stellvertretend für biologisch aktive Peptide die in Körperflüssigkeiten in grosser Verdünnung vorkommen, wird ein lösliches Peptid mit der Aminosäuresequenz NH_2-Leu-Trp-Met-Arg-Phe-Ala-COOH in das Verfahren eingesetzt. Photokupplung des Peptides an Diazirin-derivierte Glasfaserfilter und anschliessende Sequenzanalyse nach Edmann werden beschrieben.

Herstellung von photoaktivierbaren Glasfaserfiltern

Glasfaserfilter (z.B. GF/C, Firma Whatman) werden mit wasserfreier Trifluoressigsäure während 1 Stunde bei Raumtemperatur aktiviert und mit 3-(Triaethoxysilyl)-propylamin umgesetzt. Nach Auswaschen des Reagensüberschusses wird die Glasfasermembran bei 50°C (1 Stunde) behandelt. Der Grad der Belegung mit Aminofunktionen wird analytisch bestimmt.

Im Mittel werden 10 bis 15 nMol Aminofunktionen pro mg Glasfaserfilter nachgewiesen. Die chemische Kopplung von 3-(Trifluoromethyl)-3-(m-isothiocyanophenyl)diazirin an aminopropyliertes Glas erfolgt mit einem 10-fachen Ueberschuss an Vernetzer. (Zur Herstellung von Arylazidglas wird in analoger Weise das aminopropylierte Trägermaterial mit 4-Azidophenylisothiocyanat umgesetzt). Die Reaktion wird bei 40°C in Cyclohexan durchgeführt und ist nach 90 Minuten beendet. Die derivierten Glasfaserfilter werden anschliessend durch Filtration mit organischen Lösungsmitteln gewaschen.

Photokupplung des Peptides

Zur Photokupplung wird das Peptid (500 pmol, gelöst in 15 µl Wasser) auf den photoaktivierbaren Glasfaserfilter aufgetropft, mit Argon umspült und während 16 Minuten mit gefiltertem Licht einer Quecksilberdampflampe (HBO 350, Osram, 200 Watt Ausgangsleistung) bestrahlt. Die gewählte Filterkombination (WG 320 Langpassfilter, Firma Schott; 1 cm gesättigte Kupfersulfatlösung) bewirkt, dass Licht der Wellenlänge unter 320 nm wirksam absorbiert wird. Nach der Photokupplung wird der mit dem Peptid belegte Glasfaserfilter mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität gewaschen (NaCl, 1 M; Wasser; Ethanol; Chloroform; Toluol).

Sequenzanalyse des, durch Photoaktivierung gekoppelten Peptides

Zur Sequenzanalyse eignet sich das Gasphasen-Sequenzverfahren. Die Kopplungseffizienz, gemessen an der Ausbeute der N-terminalen Aminosäure beträgt 10%. Aus Kontrollversuchen, die mit photoaktivierbaren Glasfaserfiltern und Hexapeptid, jedoch ohne Lichtaktivierung durchgeführt werden, kann keine Sequenzinformation abgeleitet werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur lichtinduzierten Immobilisierung von Biomolekülen (z.B. Eiweiss-stoffen, Nukleinsäuren, Kohlehydraten, Lipiden) zum Zweck einer analytischen, diagnostischen, medizinischen und/oder gewerblichen Verwendung dadurch gekennzeichnet, dass Biomoleküle, in monomolekularen Schichten auf photoaktivierbare Trägermaterialien durch Einstrahlen von Licht oder Applikation elektrischer Energie kovalent gebunden werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass Eiweissmoleküle, Kohlehydrate oder Nukleinsäuren zum Zweck der chemischen Analyse und/oder Strukturaufklärung auf photoaktivierbare Trägermaterialien kovalent gebunden werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass immunologisch aktive Moleküle (z.B. Antigene, Antikörper, Haptene) unter Erhaltung der biologischen Aktivität auf photoaktivierbare Trägermaterialien kovalent gebunden werden.

4. Verfahren nach Anspruch 1 und 3 dadurch gekennzeichnet, dass biologisch aktive Moleküle, insbesondere Enzyme, Rezeptoren, immunologisch aktive Moleküle zum Zweck der Herstellung von Biosensoren photochemisch oder durch Applikation elektrischer Engergie immobilisiert werden.

5. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass Eiweissmoleküle, Lipide und/oder Kohlehydrate zwecks Vermeidung der Abstossung körperfremder Substanzen photochemisch auf Oberflächen von Implantaten kovalent gebunden werden.

6. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass Biomoleküle, insbesondere Eiweissmoleküle oder Teile davon, zum Zweck der Herstellung von molekularen Schaltelementen photochemisch oder durch Applikation elektrischer Energie immobilisiert werden.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/CH 91/00085

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) [6]

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl.[5] C12N 11/06

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched [7]

Classification System	Classification Symbols
Int.Cl.[5]	C12N

Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are included in the Fields Searched [8]

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT [9]

Category *	Citation of Document, [11] with indication, where appropriate, of the relevant passages [12]	Relevant to Claim No. [13]
X	JOURNAL OF LIPID RESEARCH Vol. 25, 1984, New York pages 1010 - 1012; Lingwood, C.A.: "Production of glycolipid affinity matrices by use of heterobifunctional crosslinking agents", see the whole document --	1-6
X	US, A, 4597999 (LINGWOOD, C.A.) 1 July 1986 see column 3, line 20 - column 4, line 68 see column 6, line 50 - column 7, line 15 --	1-6
X	US, A, 3959078 (GUIRE, P.E.) 25 May 1976 see column 5, line 38 - column 6, line 20 --	1-6
X	EP, A, 175973 (ORGANOGEN) 2 April 1986 see claims 1 - 2 --	1-6
	./.	

* Special categories of cited documents: [10]

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report
25 June 1991 (25.06.91)	18 July 1991 (18.07.91)
International Searching Authority	**Signature of Authorized Officer**
European Patent Office	

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Vol. 13, No. 174 (C-589)(3522) 25 April 1989, & JP-A-01 5489 (FUJI FOTO FILM CO LTD) 10 January 1989, see the whole document	1-6
	--	
A	BIOCHEMISTRY Vol. 20, No. 24, 1981, EASTON, PA US pages 6754 - 6760; Vanin, E.F. et al.: "Synthesis and application of cleavable photoactivable heterobifunctional reagents" see the whole document	1-6

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

CH 9100085
SA 45989

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 25/06/91

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US-A-4597999	01-07-86	None		
US-A-3959078	25-05-76	None		
EP-A-175973	02-04-86	DE-A-	3435744	03-04-86
		AU-B-	585253	15-06-89
		AU-A-	4769085	10-04-86
		CA-A-	1267082	27-03-90
		JP-A-	61090060	08-05-86
		US-A-	4716122	29-12-87

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/CH 91/00085

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben)[6]

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

Int.Kl. 5 C12N 11/06

II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff [7]

Klassifikationssytem	Klassifikationssymbole
Int.Kl. 5	C12N

Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen [8]

III. EINSCHLAGIGE VEROFFENTLICHUNGEN [9]

Art.°	Kennzeichnung der Veröffentlichung [11], soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile [12]	Betr. Anspruch Nr.[13]
X	JOURNAL OF LIPID RESEARCH vol. 25, 1984, NEW YORK Seiten 1010 - 1012; Lingwood,C.A.: "Production of glycolipid affinity matrices by use of heterobifunctional crosslinking agents" siehe das ganze Dokument	1-6
X	US,A,4597999 (LINGWOOD,C.A.) 01 Juli 1986 siehe Spalte 3, Zeile 20 - Spalte 4, Zeile 68 siehe Spalte 6, Zeile 50 - Spalte 7, Zeile 15	1-6
X	US,A,3959078 (GUIRE,P.E.) 25 Mai 1976 siehe Spalte 5, Zeile 38 - Spalte 6, Zeile 20	1-6
X	EP,A,175973 (ORGANOGEN) 02 April 1986 siehe Ansprüche 1-2	1-6

-/--

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen [10] :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahellegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

IV. BESCHEINIGUNG

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
25.JUNI 1991	18. 07. 91
Internationale Recherchenbehörde	**Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten**
EUROPAISCHES PATENTAMT	FERNANDEZ Y BRA F.

III. EINSCHLAGIGE VEROFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 13, no. 174 (C-589)(3522) 25 April 1989, & JP-A-01 5489 (FUJI FOTO FILM CO LTD) 10 Januar 1989, siehe das ganze Dokument	1-6
A	BIOCHEMISTRY. vol. 20, no. 24, 1981, EASTON, PA US Seiten 6754 - 6760; Vanin,E.F. et al: "Synthesis and application of cleavable photoactivable heterobifunctional reagents" siehe das ganze Dokument	1-6

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR. CH 9100085

SA 45989

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 25/06/91
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US-A-4597999	01-07-86	Keine		
US-A-3959078	25-05-76	Keine		
EP-A-175973	02-04-86	DE-A-	3435744	03-04-86
		AU-B-	585253	15-06-89
		AU-A-	4769085	10-04-86
		CA-A-	1267082	27-03-90
		JP-A-	61090060	08-05-86
		US-A-	4716122	29-12-87

EPO FORM P0479